蕲艾内生细菌的分离鉴定及抑菌活性分析

徐碧林，罗周瑜，彭陈万里，武卉，张子烨，郑玥，郑永良*

(黄冈师范学院 生物与农业资源学院，经济林种质资源改良与综合利用湖北省重点实验室 湖北省大别山特色资源开发协同创新中心，湖北 黄冈 438000)

摘要：为探究蕲艾不同组织内生菌组成及其次级代谢产物的抑菌活性，该研究采用组织培养法对蕲艾根、茎和叶内生细菌进行分离，用滤纸片法检测内生菌发酵液挥发物对六种常见病原菌的抑菌活性，并分别对其最低抑菌浓度(MICs)和最低杀菌浓度(MBCs)进行测定，结合形态观察、生理生化性质及 16S rDNA 序列测定对分离菌株进行鉴定。结果表明：(1)菌株 lzy-21、lzy-20 和 lzy-1 分别具有较强的产纤维素酶、蛋白酶和脂肪酶的能力。(2)菌株 lzy-20 和 wnn4-3 发酵液挥发物对大肠杆菌、产气肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 MICs 均为 16 μg·mL^{-1}；对三者的 MBCs 依次为 32、32、16 μg·mL^{-1} 和 16、32、32 μg·mL^{-1}。(3)菌株 lzy-12 对金黄色葡萄球菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌的 MICs 均为 16 μg·mL^{-1}，对二者的 MBCs 分别为 32 μg·mL^{-1} 和 16 μg·mL^{-1}。(4)菌株 lzy-17 和 lzy-21 对小肠结肠炎耶尔森氏菌的 MICs 均为 16 μg·mL^{-1}，MBCs 分别为 16 μg·mL^{-1} 和 32 μg·mL^{-1}。其中，菌株 lzy-1 为首次从植物中分离到的皮提不动杆菌(*Acinetobacter pittii*)，菌株 lzy-20、lzy-21 和 wnn4-3 依次为高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*)、韩国芽孢杆菌(*Bacillus koreensis*)和暹罗芽胞杆菌(*Bacillus siamensis*)，菌株 lzy-12 和 lzy-17 分别为松果黄体杆菌(*Luteibacter pinisoli*)和嗜烟节杆菌(*Paenarthrobacter nicotinovorans*)。上述结果为充分利用内生菌资源生产工业用酶以及深入探究蕲艾功能内生菌及其作用机制奠定了基础。

关键词：蕲艾，内生细菌，产酶，抑菌活性，16S rDNA

中图分类号： **文献标识码：A** 文章编号：

Isolation, identification, and antimicrobial activities of endophytic bacteria from *Artemisia argyi* var. *argyi* cv. *Qiai*

XU Bilin, LUO Zhouyu, PENG Chenwanli, WU Hui, ZHANG Ziye, ZHENG Yue, ZHENG Yongliang*

(*College of Biological and Agricultural Resources*, *Huanggang Normal University*; *Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization*, *Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains*, Huanggang 438000, Hubei, China.)

Abstract: The composition of endophytic bacteria in different tissues of *Artemisia argyi* var. *argyi* cv. *Qiai*, and the antibacterial activities of their secondary metabolites were the main focus of this study. The tissue culture method was used to isolate the endophytic bacteria from roots, stems and leaves of *Artemisia argyi* var. *argyi* cv. *Qiai* and then, the antibacterial activity of the

基金项目：湖北省重点研发项目(2020BBB091)；中央引导地方科技项目(2019zyyd044)；湖北省教育厅科学技术研究计划青年人才项目(Q20182901)；湖北省重点实验室、大别山特色资源开发湖北省协同创新中心联合开放基金项目(2021CX03)[Supported by Key Research and Development Program of Hubei Province of China(2020BBB091), Project of Central Government Supported Local Science and Technology Development(2019zyyd044), Science and Technology Research Program Youth Talent Project of Hubei Education Department (Q20182901), Joint Open Fund project of Hubei Provincial Key Laboratory and Hubei Collaborative Innovation Center of Dabie Mountain Characteristic Resources Development(2021CX03)]。

第一作者：徐碧林(1986-)，博士，讲师，研究方向为微生物生理生化，xubilin@whu.edu.cn。

*__通信作者：__郑永良，博士，教授，研究方向为微生物生理生化，11169214@qq.com。

volatiles from endophytic bacterial fermentation broth against six common pathogenic bacteria was assayed by the disk diffusion test. Meanwhile, the minimum inhibitory concentrations(MICs) and the minimum bactericidal concentrations(MBCs) were also determined. Finally, the isolated strains were identified based on phenotypical and biochemical properties as well as 16S rRNA gene sequencing.The results showed that, (1)among the thirteen strains isolated, strains lzy-21, lzy-20 and lzy-1 have strong capacity of producing cellulase, protease and lipase respectively. (2)The MICs of the volatiles of lzy-20 and wnn4-3 to *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus subtilis* were all 16 μg·mL^{-1}. The MBCs of the them were 32, 32, 16 μg·mL^{-1}, 16, 32, 32 μg·mL^{-1}, respectively. (3)The MICs of lzy-12 against *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* were 16 μg·mL^{-1}, and the MBCs of them were 32 μg·mL^{-1} and 16 μg·mL^{-1}, respectively. (4)The MICs of both lzy-17 and lzy-21 against *Y. enterocolitica* were 16 μg·mL^{-1}, and the MBCs were 16 μg·mL^{-1} and 32 μg·mL^{-1} respectively. Strain lzy-1 was identified as *Acinetobacter pittii*, which was isolated from plants for the first time. lzy-20, lzy-21, wnn4-3, lzy-12, and lzy-17 were identified as *Bacillus altitudinis*, *Bacillus koreensis*, *Bacillus siamensis*, *Luteibacter pinisoli*, and *Paenarthrobacter Nicotinovorans*, respectively. The above results lay a foundation for making full use of endophytic bacteria resources to produce industrial enzymes, and further exploring the mechanisms of how endophytic bacteria interact with *Artemisia argyi* var. *argyi* cv. *Qiai*.

Key words: *Artemisia argyi*, endophytic bacteria, enzyme-production, antibacterial activity, 16s rDNA

植物内生菌是指生活史中某一阶段或整个阶段定殖在植物各组织器官或细胞间隙内的一类对植物自身不引起明显病害症状的微生物，包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌等(Matsumoto et al., 2017; Uzma et al., 2018)。对内生菌与宿主植物的相互影响研究表明，它们对植物本身具有促进生长、增强抗逆性、生物防治和生物修复等有益的生物学功能(De Lamo et al., 2020; El-Sayed et al., 2020; Giauque et al., 2019; He et al., 2020)。不仅如此，药用植物内生菌还会获得与宿主相同的部分代谢途径，从而合成与宿主相同或相似的、具有潜在的抗菌、抗虫、抗癌、抗病毒、抗氧化、免疫制剂、降糖等生物活性的次生代谢产物(Gouda et al., 2016; 黄敬瑜等, 2017; Nongkhlaw et al., 2017)。因此，充分发掘药用植物内生菌具有广阔的应用前景。

艾草(*Artemisia argyi*)隶属于菊科艾属，是一种功能性药用植物(Song et al., 2019)。蕲艾为湖北省蕲春县特产，中国国家地理标志产品，湖北省道地药材，具有护肝、抗肿瘤、抗菌、镇痛、抗炎等多种药理作用(Dong et al., 2018; 洪宗国, 2015)。明代医圣李时珍在《本草纲目》中就有对蕲艾的推崇："(艾叶)自成化以来，则以蕲州者为胜，用充方物，天下重之"，谓之"蕲艾"。肖宇硕等(2018)对蕲艾及不同产地艾叶挥发油进行了一系列的比较研究，结果发现不同产地艾叶挥发性成分有一定差异，其中蕲艾品质最好。此外，向福等的研究还发现蕲艾挥发油具有较好的抑菌和杀菌活性(Xiang et al., 2018)。

近年来，关于蕲艾的种植、提取液、化学组分、药理作用及艾灸和艾贴等产品开发研究得较多，对蕲艾内生菌的研究报道较少。Shi 等(2017)从蕲艾艾叶中分离得到内生真菌 *Trichoderma koningiopsis* QA-3，并从其发酵液中成功分离鉴定出具有抗菌活性的 5 种新型真菌多酮类化合物和 2 种已知的酮类类似物。目前还尚未见对蕲艾内生细菌的相关报道。本研究分别从蕲艾的根、茎和叶中分离内生细菌，从微生物的分离、形态、生理生化特征、分子生物学鉴定和发酵液抑菌活性入手，探讨蕲艾内生细菌对常见的人类病原菌的抗菌作用及其产酶特性，旨为探寻有效拮抗微生物资源以及蕲艾的进一步开发利用提供理论依据，为充分

利用内生菌资源生产工业用酶提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品蕲艾：采自湖北省黄冈市蕲春县赤东镇三渡村五组大田种植，样品采集后用自封袋密封后马上回实验室进行内生细菌的分离。

供试菌株：大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、变形杆菌 *Proteusbacillus vulgaris*) 和小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)均保存于黄冈师范学院经济林种质资源改良与综合利用湖北省重点实验室。

培养基：LB 固体及液体培养基(1 L)(蛋白胨 10 g，酵母提取物 5 g，NaCl 10 g，pH 7.0；固体加琼脂粉 18 g)用于蕲艾不同组织内生细菌的分离扩繁。淀粉培养基(1 L)(牛肉膏 5 g，蛋白胨 10 g，氯化钠 5 g，可溶性淀粉 2 g，pH 7.0~7.2，琼脂 18 g)、牛奶培养基(LB 固体培养基中加入 11%灭菌的脱脂奶粉)、刚果红培养基(1 L)(羧甲基纤维素钠 15 g，蛋白胨 5 g，KH_2PO_4 2.0 g，$MgSO_4$ 0.2 g，NaCl 5 g，琼脂 18 g，刚果红 0.2 g，pH 7.0)和油脂培养基(LB 固体培养基加入 1%吐温 80)分别用来筛选产淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶的内生细菌。蛋白胨水培养基((1 L)：蛋白胨 10 g，NaCl 15 g，pH 7.3~7.5)、蔗糖/葡萄糖发酵培养液(蛋白胨水培养基 1 L，1.6%溴甲酚紫乙醇溶液 1.5 mL，20%蔗糖溶液(蔗糖发酵)，20%葡萄糖溶液(葡萄糖发酵))、葡萄糖蛋白胨水培养液((1 L)：葡萄糖 5 g，蛋白胨 5 g，K_2HPO_4 2 g，pH 7.2~7.4)、明胶液化培养基((1 L)：蛋白胨 5 g，明胶 100~150 g，pH 7.2~7.4)和柠檬酸盐培养基((1 L)：柠檬酸钠 2 g，K_2HPO_4 1 g，$NH_4H_2PO_4$ 1 g，NaCl 5 g，$MgSO_4$ 0.2 g，琼脂 18 g，1%溴麝香草酚蓝(酒精溶液)10 mL，pH 6.8)分别用来进行吲哚试验、蔗糖/葡萄糖发酵试验、乙酰甲基甲醇试验(VP 试验)/甲基红试验(MR 试验)、明胶水解试验和柠檬酸盐试验。

1.2 方法

1.2.1 内生菌的分离纯化

参照专利“一种艾草内生菌的分离方法”分离蕲艾根、茎和叶的内生细菌(徐碧林等, 2019)。取健康、无病害的艾叶、茎和根各约 5 g，用自来水冲洗干净后，用滤纸吸干表面水分，剪成小片(叶片)/段(茎和根)放入灭菌平皿中，再用无菌水洗涤 3 次并吸干。然后用 75%乙醇浸泡叶片 30 s，茎段和根 60 s。无菌水浸泡冲洗 5 次并吸干，再用 2.5%次氯酸钠溶液浸泡叶片 2 min，5%次氯酸钠溶液浸泡茎段和根 3 min，无菌水浸泡 2 min，循环 3 次，最后使用无菌滤纸吸干残留的水分。吸取最后一次漂洗的无菌水 200 μL 涂布于 LB 培养基平板，验证消毒效果。

将消毒好的组织样品放入无菌研钵中，向其内加入 9 mL 无菌生理盐水和无菌石英砂，研磨至成匀浆状，然后 100 倍梯度稀释，取 200 μL 的适当梯度稀释液至 LB 固体培养平板上，均匀涂布，最后分别置于 28 °C 和 37 °C 培养。挑选菌落形态不同的单菌落纯化，并将形态大部分相似的菌落划归为同一类，保存菌株备用。

1.2.2 生理生化特征测定

参照《微生物学实验教程》(周德庆等, 2013)，采用平板划线法分离得到内生细菌单菌落，记录菌落的颜色、形态、透明度等，并在显微镜下观察其形态特征及革兰氏染色反应。随后参考《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)测定筛选菌株的生理生化反应。此外，挑取活化后的内生细菌，分别在含淀粉培养基平板、牛奶培养基平板、刚果红培养基平板和油脂培养基平板上划线，37 °C 培养 1~2 d 后，在淀粉培养基平板上平铺一层卢戈氏碘液，其余平板不做处理，分别观察淀粉平板、牛奶平板和刚果红平板上菌落周围的透明水解圈，以及吐温 80 平板上的白色晕圈，测量并计算透明水解圈和白色晕圈与菌落直径的比值。

1.2.3 16S rDNA 分子生物学鉴定

提取筛选菌株的染色体总 DNA，以菌株的总 DNA 为模板，利用通用引物对 27F：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 1492R：5'-TACCTTGTTACGACTT-3'扩增菌株 16s rDNA 基因。25 μL 的反应体系：模板 1 μL，上、下游引物各 1 μL，ddH_2O 9.5 μL，Taq DNA 聚合酶 Mix12.5 μL。PCR 反应条件：94 °C 预变性 3 min，94 °C 变性 30 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共 30 个循环，最后 72 °C 延伸 10 min。取 PCR 产物于 1%的琼脂糖凝胶上电泳，然后根据试剂盒操作说明回收 DNA 片段，回收后的片段委托上海生工生物工程有限公司测序。根据测序结果，将序列在 EzBioCloud(https://www.ezbiocloud.net/resources/16s_download)数据库中进行同源性比对(Yoon, 2017)，采用 MEGA 7.0 中的 CLUSTAL_W 模块将菌株的 16s rDNA 序列与其同源关系相近的序列比对分析后，把两头的序列剪切整齐，转换格式后，用 MEGA 7.0 中的 Neighbor-Joining 模块构建系统进化树，1 000 次随机抽样，计算自引导值(Bootstrap)以评估系统进化树的置信度(Kumar et al., 2016)。

1.2.4 筛选菌株发酵液挥发物抑菌试验

初筛：将筛选菌株活化并进行平板划线，挑单菌落于 37 °C 液体培养 12 h，按 1%的接种量接种至 100 mLLB 液体培养基中，37 °C，180 r，发酵 5 d。超声破细胞后，按发酵液：乙酸乙酯 1∶1(V/V)的比例沿着器皿内壁缓慢加入(防止乳化)乙酸乙酯，超声萃取三次后，合并三次得到的萃取液，用旋转蒸发仪在 35 °C 减压条件下浓缩乙酸乙酯相，并最终定容至 500 μL，4 °C 保存备用。活化靶标菌后，挑单菌落，在 LB 培养基平板上纵横交叉密集划线。再在密集划线的平板上等距贴直径为 6 mm 的灭菌双层滤纸片，每一个滤纸片上滴加 8 μL 内生细菌挥发油，每一种内生细菌挥发油做三组平行试验，并以等体积 0.3 $mg·mL^{-1}$ 的卡那霉素作为阳性对照(+)，等体积乙酸乙酯作为阴性对照(−)。将处理好的平板置于 4 °C 扩散 1 d，37 °C 培养 1 d 后，测量并计算平均抑菌圈直径Φ。

复筛：采用 Silva 描述的方法对筛选菌株发酵液挥发物的最低抑菌浓度(MICs)和最低杀菌浓度(MBCs)进行了测定(Silva et al., 2011)。用 LB 培养基对具有显著抑菌效果的菌株发酵液挥发物进行两倍梯度稀释(1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0、128.0、256.0 和 512.0 $μg·mL^{-1}$)，用于测定它们最低抑菌浓度。在稀释后的培养液中分别加入 50 μL 约 10^7 $CFU·mL^{-1}$ 的对应菌液，将三组接种后的菌液置于 37 °C、180 $r·min^{-1}$ 培养箱培养 36 h。培养后完全抑制菌株生长的挥发物的最低浓度即为 MICs。MICs 实验结束后，从每一个浓度梯度的试管中取 200 μL 培养物分别涂在 LB 平板上，无微生物生长的平板上相应浓度被确定为 MBCs。

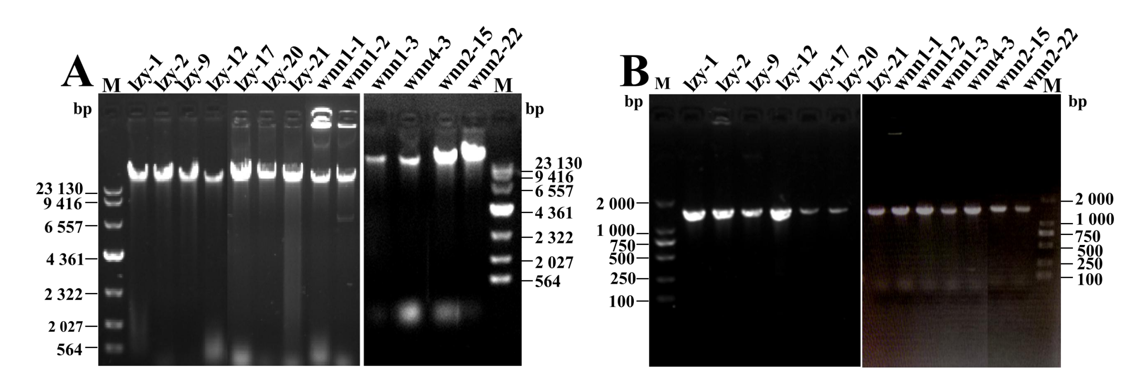
2 结果

2.1 蕲艾内生细菌的分离结果

最后一次清洗试验材料的无菌水涂布 LB 平板，置于 37 °C 培养 1 周没有微生物生长，说明试验材料表面消毒彻底，分离到的细菌均为蕲艾内部所有，而非外界环境污染所致。本试验一共从蕲艾的根、茎和叶中分别分离到 6 株、7 株、7 株内生细菌。

2.2 筛选菌株总 DNA 的提取和 16s rDNA 扩增结果

筛选菌株基因组 DNA 提取结果见图 1A，基因组 DNA 在电泳图上的 23 130 bp 附近一条明显的条带，可以用于 PCR 扩增。以基因组 DNA 为模板，以及通用引物对 27F/1492R，扩增得到了特异性长度约为 1 500 bp 的目的条带(图 1：B)。



A. 基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳； **B.** 16S rDNA 扩增结果琼脂糖凝胶电泳图。

A. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA; B. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplification products.

图 1 内生细菌基因组 DNA 和 16S rDNA 扩增结果琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of endophytic bacterial genomic DNA and 16S rDNA amplification products

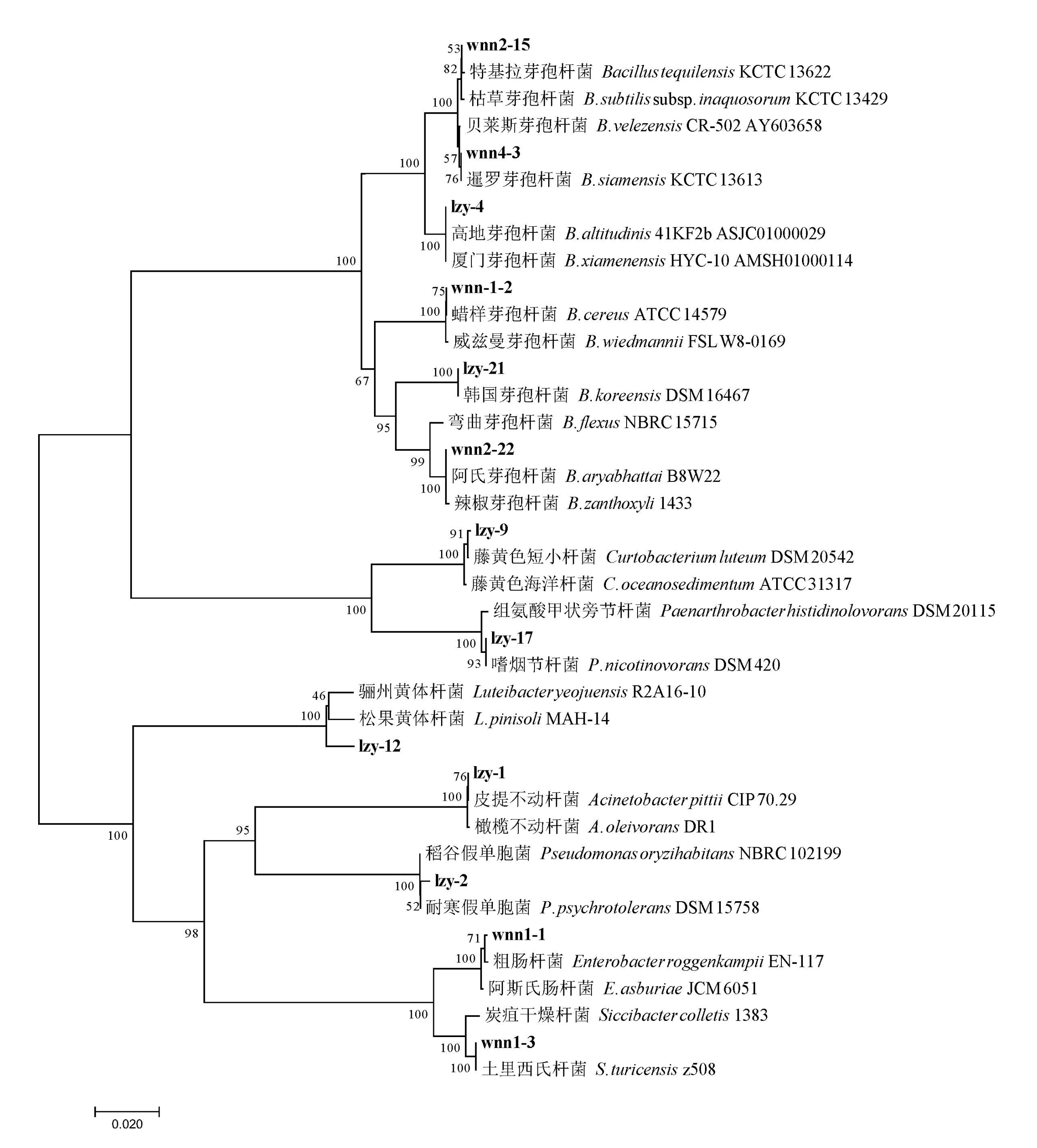
2.3 筛选菌株系统进化分析结果

对 20 株内生细菌的 16S rDNA 序列进行比对发现，来源于叶和茎的内生细菌的 16S rDNA 序列同源性为 100%，表明它们共有相同的内生细菌。将来源于茎和根的 13 株内生细菌的基因序列提交到 EzBioCloud 数据库(https://www.ezbiocloud.net/resources/16s_download)中进行同源性比对，查找与其同源性大于 99%的菌株，最终确定蕲艾不同组织中的内生细菌归属。如表 1 和图 2 所示，来源于蕲艾茎和叶中共有内生细菌含有 6 属 7 种，分别为芽孢杆菌属(*Bacillus*)2 株、不动杆菌属(*Acinetobacter*)1 株、假单胞菌属(*Pseudomonas*)1 株、短小杆菌属(*Curtobacterium*)1 株、黄体杆菌属(*Luteibacter*)1 株和类节杆菌属(*Paenarthrobacter*)1 株；来源于蕲艾根的内生细菌含有 3 属 6 种，分别为芽孢杆菌属(*Bacillus*)4 株、肠杆菌属(*Enterobacter*)1 株和干燥杆菌属(*Siccibacter*)1 株。蕲艾的内生细菌在茎和叶中的组成几乎相同，叶和茎与根中的内生细菌种类只共有 1 个属，其余都不共有。

表 1 蕲艾不同组织内生细菌比较

Table 1 Comparison of endophytic bacteria in different tissues of *Artemisia argyi*

茎和叶 Stem and leaf		根 Root	
不动杆菌属	*Acinetobacter pittii*	肠杆菌属	*Enterobacter roggenkampii*
假单胞菌属	*Pseudomonas psychrotolerans*	干燥杆菌属	*Siccibacter turicensis*
短小杆菌属	*Curtobacterium luteum*	芽孢杆菌属	*Bacillus aryabhattai*、
黄体杆菌属	*Luteibacter pinisoli*		*B. siamensis* 、
类节杆菌属	*Paenarthrobacter nicotinovorans*		*B. cereus*、
芽孢杆菌属	*Bacillus altitudinis*, *B. koreensis*		*B. tequilensis*



分支点上的数值为 1 000 次自展值分析所得值，标尺 0.020 为进化距离.

Numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1 000 replications, Bar, 20 nt substitutions per 1 000 nt.

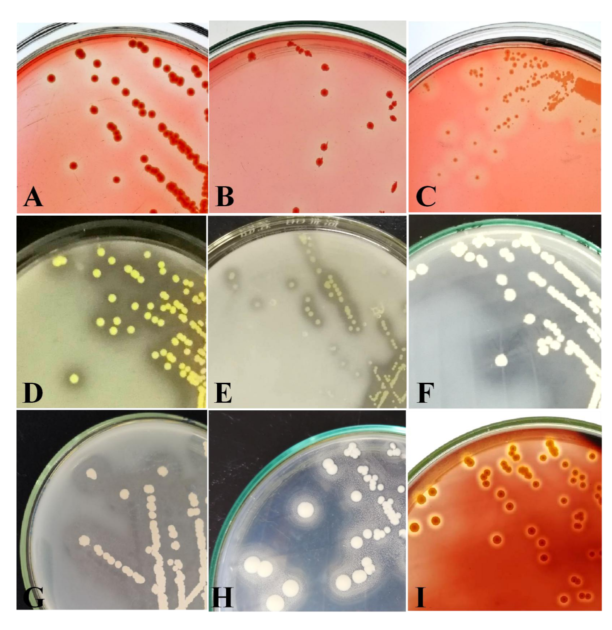
图 2 基于 16S rDNA 序列的蕲艾内生细菌系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of endophytic bacteria from *Artemisia argyi* based on 16S rDNA sequences

2.4 筛选菌株的生理生化特征

对分离获得的 13 株内生细菌进行了葡萄糖发酵、蔗糖发酵、VP 试验和产酶等生理生化特征检测(表 2)，部分菌株产酶结果见图 3，从图 3:A-C 中可以看出，lzy-17、lzy-20 和 lzy-21 均能在刚果红培养基平板上产生不同大小的水解圈，表明它们均能分泌纤维素酶，其中 lzy-21 产纤维素酶能力最强，水解圈与菌落直径比约为 6.0；从图 3B-G 中可以看出，lzy-1、lzy-9、lzy-12 和 lzy-20 均能在牛奶平板上产生不同大小的透明水解圈，表明它们均能分泌蛋

白酶，其中 lzy-1 和 lzy-20 产蛋白酶能力最强，水解圈与菌落直径比约为 4.0；从图 3H 中可以看出，lzy-1 能在含吐温 80 平板上产生与菌落直径比约为 3.5 的白色晕圈，表明其能分泌脂肪酶。从图 3I 中可以看出，lzy-12 能在含淀粉平板上产生与菌落直径比约为 2.5 的透明水解圈，表明其能分泌淀粉酶。



A-C. lzy-17、lzy-20 和 lzy-21 在纤维素刚果红培养基平板上产生透明水解圈情况；**D-G**. lzy-9、lzy-12 和 lzy-20 在牛奶平板上产生透明水解圈情况； **H.** lzy-1 在含 1%吐温 80 的平板上产生白色晕圈情况； **I.** lzy-12 在淀粉培养基上产生透明圈的情况。

A-C. Hydrolytic circles produced on the cellulose Congo red medium plate by lzy-17、lzy-20, and lzy-21; **D-G.** Hydrolytic circles produced on the milk plate by lzy-9、lzy-12, and lzy-20; **H.** White halocircles produced on the plate containing 1% Tween 80 by lzy-1; **I.** Hydrolytic circles produced on the starch medium plate by lzy-12.

图 3 内生细菌产酶情况检测

Fig. 3 The hydrolysis of different substrates by endophytic bacteria

表 2 内生细菌生理生化试验结果和细胞特征

Table 2 Physiological and biochemical test results and cell characteristics of endophytic bacteria

理化特征 Physiological and biochemical characteristics	菌株编号 Strains												
	lzy-1	lzy-2	lzy-9	lzy-12	lzy-17	lzy-20	lzy-21	wnn1-1	wnn1-2	wnn1-3	wnn2-15	wnn2-22	wnn4-3
蔗糖发酵 Sugar fermentation	—	—	+	—	+	+	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	+
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+	+	+	—	+	+	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	+
VP 试验 Voges-Prokauer test	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	+	+	+
MR 试验 Methyl red test	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	+	—	+
明胶水解试验 Gelatin hydrolysis test	+	—	+	+	—	+	+	—	+	—	+	—	—
柠檬酸盐试验 Citrate test	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+
吲哚试验 Indol test	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
革兰氏染色 Gram staining	—	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+	—	+
形态 Morphology	短杆 Short Rod	短杆 Short Rod	杆状 Rod	短杆 Short Rod	短杆 Short Rod	短杆 Short Rod	杆状 Rod	短杆 Short Rod	杆状 Rod	短杆 Short Rod	杆状 Rod	杆状 Rod	杆状 Rod
菌落颜色 Colony color	白色 White	淡黄 Pale Yellow	亮黄色 Bright Yellow	深棕黄 Deep Brown	黄色 Yellow	白色 White	黄色 Yellow	浅黄 Pale Yellow	浅黄 Pale Yellow	暗黄色 Dark Yellow	棕黄 Pale Brown	棕黄 Pale Brown	浅黄 Pale Yellow
蛋白酶 Protease	—	—	++	++	—	++	+	—	+	—	+	+	—
脂肪酶 Lipase	++	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—
纤维素酶 Cellulase	—	—	—	—	++	++	+++	—	+	—	+	+	+
淀粉酶 Amylase	—	—	—	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：+表示阳性，—表示阴性，⊕表示产酸产气。

Note: + indicates positive, — indicates negative, ⊕ indicates produce acid and gas.

2.5 筛选菌株发酵液挥发物的抑菌效果

以常见的 6 种病原菌作为靶标菌，采用滤纸片扩散法对筛选菌株发酵液挥发物抑菌活性进行初筛，结果见表 3，除了 lzy-9，其余 12 株细菌挥发物具有不同程度的抑菌活性，占分离菌株的 92.3%。对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、产气肠杆菌、枯草芽孢杆菌、变性杆菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌具有抑菌作用的菌株分别有 8 株、5 株、8 株、7 株、5 株和 3 株，其中 lzy-20 对大肠杆菌、产气肠杆菌和枯草芽孢杆菌都具有相对较好的抑菌活性，wnn4-3 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和变形杆菌均具有相对较好抑菌活性，lzy-12 对金黄色葡萄球菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌均具有较好的抑菌活性，lzy-17 和 lzy-21 都对小肠结肠炎耶尔森氏菌均具有较好的抑菌活性。

表 3 内生细菌发酵液挥发物抑菌效果

Table 3 Bacteriostatic effect of endogenous bacterial volatile oil

指示菌 Indicator	内生细菌挥发物抑菌效果 Bacteriostatic effect of endophytic bacteria volatiles												
	lzy-1	lzy-2	lzy-9	lzy-12	lzy-17	lzy-20	lzy-21	wnn 1-1	wnn 1-2	wnn 1-3	wnn 2-15	wnn 2-22	wnn 4-3
大肠杆菌 *Escherichia coli*	+	+	—	+	—	++	—	+	—	+	+	—	++
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	++	—	—	++	—	—	—	+	—	+	+	+	+
产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*	+	+	—	—	+	++	—	+	+	—	—	+	+
枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*	+	+	—	—	+	++	—	+	—	—	—	+	++
变形杆菌 *Proteusbacillus vulgaris*	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	++
小肠结肠炎耶尔森氏菌 *Yersinia enterocolitica*	—	—	—	++	++	—	++	—	—	—	—	—	—

注：0＜Φ(平均抑菌圈直径)＜6 mm，记为"—"；6 mm＜Φ＜9mm，记为"+"；Φ＞9 mm，记为"+ +"。

Note: 0＜Φ(Mean inhibition zone diameter)＜6 mm, denoted as"—". 6 mm＜Φ＜9mm, denoted as"+ ". Φ＞9 mm, denoted as"+ +".

对具有抑菌效果的菌株发酵液挥发物的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度进行测定，结果如表 4 所示，其中 lzy-20 对大肠杆菌、产气肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 MICs 均为 16 μg·mL^{-1}，对三者的 MBCs 依次为 32 μg·mL^{-1}、32 μg·mL^{-1} 和 16 μg·mL^{-1}。wnn4-3 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和变形杆菌均的 MICs 均为 16 μg·mL^{-1}，对三者的 MBCs 依次为 16 μg·mL^{-1}、32 μg·mL^{-1} 和 32 μg·mL^{-1}。lzy-12 对金黄色葡萄球菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌的 MICs 均为 16 μg·mL^{-1}，对二者的 MBCs 分别为 32 μg·mL^{-1} 和 16 μg·mL^{-1}。lzy-17 和 lzy-21 都对小肠结肠炎耶尔森氏菌的 MICs 均为 16 μg·mL^{-1}，二者对其 MBCs 分别为 16 μg·mL^{-1} 和 32 μg·mL^{-1}。

表 4 内生细菌发酵液挥发物 MICs 和 MBCs

Table 4 MICs and MBCs of endophytic bacteria fermentation broth volatiles

指示菌指示菌 Indicator	最低抑菌浓度 Minimum inhibitory concentration(MICs)/ 最低杀菌浓度 Minimum bactericidal concentration (MBCs, μg·mL^{-1})											
	lzy-1	lzy-2	lzy-12	lzy-17	lzy-20	lzy-21	wnn1-1	wnn1-2	wnn1-3	wnn2-15	wnn2-22	wnn4-3
大肠杆菌 *Escherichia coli*	32/64	64/128	32/64	—	16/32	—	32/64	—	32/64	32/64	—	16/16
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	16/32	—	16/32	—	—	—	32/32	—	32/64	64/64	32/32	32/32
产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*	32/32	32/64	—	32/64	16/32	—	32/64	64/64	—	—	32/64	64/128
枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*	32/64	32/64	—	64/64	16/16	—	64/128	—	—	—	64/128	16/32
变形杆菌 *Proteusbacillus vulgaris*	—	—	—	—	—	—	—	32/64	64/128	32/32	32/32	16/32
小肠结肠炎耶尔森氏菌 *Yersinia enterocolitica*	—	—	16/16	16/16	—	16/32	—	—	—	—	—	—

注：—表示初筛时 0＜Φ(平均抑菌圈直径)＜6 mm。

Note: — indicates 0＜Φ(Mean inhibition zone diameter)＜6 mm at inital screening.

3 讨论与结论

本试验从蕲艾茎、叶和根中分别分离得到 7 株、7 株和 6 株内生细菌，16S rDNA 全序列的系统发育分析及生理生化试验结果显示，来源于蕲艾茎和叶中的共有内生细菌含有 6 属 7 种，来源于蕲艾根的内生细菌与来源于茎和叶的内生细菌共有 1 个属。上述结果表明，蕲艾内生细菌在地上和地下组织中的组成不同，不同的内生细菌对蕲艾的组织具有差异性和专一性。

我们分离得到的 13 种内生细菌中，*Acinetobacter pittii* 和与其亲缘关系较近的 *A. baumannii*、*A. nosocomialis* 组成的 Acb 复合体是重要的院内感染病原体，随着抗生素的广泛应用，越来越多的 *A. pittii* 被鉴定为多重耐药菌株(Wang et al., 2020)。根据巴斯德研究所 MLST 数据库的最新数据，*A. pittii* 的来源有人类、兔子、白鹳、火鸡和鱼类，其中人类是 *A. pittii* 及其许多变种的主要宿主，鱼类可能是其新兴宿主(Li et al., 2017; Wang et al., 2020)，目前还未见植物源的 *A. pittii* 报道，本研究分离得到 *A. pittii* lzy-1 系首次从植物中分离到皮提不动杆菌。*Pseudomonas psychrotolerans* 的部分菌株在一定条件下可以促进植物生长(Kang et al., 2020; Liu et al., 2017)。*Curtobacterium luteum* 的菌株具有抗病原菌的作用(Suhandono et al. 2016)，且与甲霜灵同时处理黑胡椒能大幅减少线虫感染，还能促进黑胡椒的生长并提高其产量(Bhai et al., 2017)。该结果表明，本研究分离得到的 *Pseudomonas psychrotolerans* lzy-2 和 *Curtobacterium luteum* lzy-9 可能具有潜在的促生和生防价值。自 2010 年以来，对 *Luteibacter pinisoli* 的报道较少，Akter 等(2018)从红松根际土壤分离到一株能降解酪蛋白的 *L. pinisoli* MAH-14，Baltrus 等(2019)对该菌进行了全基因组测序。本研究分离得到的 *L. pinisoli* lzy-12 也具有较强的产蛋白酶能力，该类菌株可能参与宿主的代谢活动。截至目前，对 *Paenarthrobacter nicotinovorans* 的报道也比较少，Maeng 等(2018)首次从韩国土壤中分离到耐辐射的 *P. nicotinovorans*，其可能能提高作物对辐射的耐受性。据此，我们推测来源于蕲艾的内生细菌 *P. nicotinovorans* lzy-17 也能提高其宿主的耐辐射能力。

Bacillus 是内生细菌的优势菌群之一，*B.altitudinis* 的菌株是新型的马铃薯赤霉病潜在生物防治剂(Li et al., 2019)，还可以减轻低磷和高盐胁迫对小麦的损伤(Yue et al., 2019)，此外，它们不仅能促进水稻生长，还能提高抗旱能力(Kumaravel et al., 2018)。从狐尾藻中分离得到耐受高浓度锰离子的 *B. cereus* WSE01 不仅能促进狐尾藻的生长，还能增强其对锰离子的耐受性(Tang et al., 2020)。*B. tequilensis* 的菌株不仅是防治番茄枯萎病最有效且环保的化学杀菌剂替代品，还能抑制稻瘟病菌及促进大白菜幼苗的生长(Bhattacharya et al., 2019; Kang et al., 2019; Li et al., 2018)。*B. aryabhattai* 的菌株可以提高番茄对盐的耐受性、提高海蓬子属多枝柽柳种子的萌发率、促进植物生长并降解人工污染土壤中的磷胺(Dash et al., 2020; Figueira et al., 2019; Yoo et al., 2019)。除了单独发挥作用，*B. aryabhattai* H26-2 和 *B. siamensis* H30-3 同时接种不仅可以促进大白菜生长，还能缓解高温和干旱胁迫(Jeong et al., 2019)。来源于 *B. siamensis* 的菌株产生的挥发物可以在不需要生长素或乙烯/茉莉酸的情况下促进根的发育，从紫锥肉苁蓉根中分离的 *B. siamensis* CV5 分泌的可辐射诱导的具有辐射防护作用的胞外多糖 CV5，可以减少电离辐射产生的自由基损伤(Sihem et al., 2019)。Zhou 等的研究表明，*B. koreensis* 181-22 能促进水稻生长，缓解镉胁迫(Zhou et al., 2021)。上述结果表明，本研究分离得到的 *B. altitudinis* lzy-4、*B. cereus* wnn1-2、*B. tequilensis* wnn2-15、*B. aryabhattai* wnn2-22、*B. siamensis* wnn4-3 和 *B. koreensis* lzy-21 可能是潜在的生防或促生菌。

在水果粉、配方奶粉、香料和草药中可检测到 *Siccibacter turicensis*，它们和与食物相关的致病菌 *Cronobacter* 成员有较近的亲缘关系，2018 年 Lepuschitz 等首次从奥地利口角炎患者的唇角分离到 *Siccibacter turicensis*，表明其具有致病性(Sarah et al., 2018)。本研究分离得到的 *S. turicensis* wnn1-3 的生理功能还有待进一步研究。Sutton 等利用计算机对已经测序的肠杆菌序列进行分析发现，*Enterobacter roggenkampii* 是 *E. asburiae* 的同义词，*E. asburiae* 的菌株可以通过抑制铁的吸收来降低玉米植株中镉的毒性、具有杀线虫和促进植物生长的活性，*E. asburiae* Vt-7 挥发物对花生贮藏过程中产生的黄曲霉和黄曲霉毒素具有抗性(Gong et al., 2019; Mira et al., 2018; Sutton et al., 2018; Zhou et al., 2019)。该结果表明，本研究分离得到的 *E. roggenkampii* wnn1-1 可能具有生物防治功能。

本研究分离的菌株中，*Acinetobacter pittii*lzy-1 系首次从植物中分离到皮提不动杆菌，*Luteibacter pinisoli* 报道较少，已报道的与我们分离得到的其余 11 种内生菌同属的菌株分别拥有各自有益的生物学功能，体现在促进生长、增强抗逆性、生物防治、生物修复和具有良好的抗菌效果等方面。因此，我们猜测，从蕲艾中分离得到的这些内生细菌，与蕲艾本身易于种植、植株高大、全草入药及其良好抑菌效果之间有一定的关联，可能是在长期进化中，内生菌菌株促进蕲艾生长，增强其对环境的耐受性；同时它们也获得了蕲艾本身的部分特性，从而实现与宿主植物共同进化。

参考文献：

AKTER S, HUQ MA. 2018. *Luteibacter pinisoli* sp. nov., a casein degrading bacterium isolated from rhizospheric soil of *Pinus koraiensis*[J]. Arch Microbiol, 200(7): 1017-1023.

BALTRUS DA, CLARK M, INDERBITAIN P, et al., 2019. Complete genome sequence of

Luteibacter pinisoli MAH-14[J]. Microbiol Resour Ann, 8(29): e00774-00719.
BHAI RS, EAPEN SJ, KUMAR A, et al., 2017. Mitigating phytophthora foot rot and slow decline diseases of black pepper through the deployment of bacterial antagonists[J]. J Spiece Aromat Crop, 26(2): 69-82.
BHATTACHARYA A, GIRI VP, SINGH S, et al., 2019. Intervention of bio-protective endophyte *Bacillus tequilensis* enhance physiological strength of tomato during Fusarium wilt infection[J]. Biological Control, 139: 104074.
DASH DM, OSBORNE JW. 2020. Biodegradation of monocrotophos by a plant growth promoting *Bacillus aryabhattai* VITNNDJ5 strain in artificially contaminated soil[J]. Int J Environ Sci Te, 17(3): 1475-1490.
DE LAMO F, TAKKEN F. 2020. Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance[J]. Front Plant Sci, 11: 37-37.
DONG XZ, CAI MY. 2001. Handbook of systematic identification of common bacteria. Beijing: Science Press. [东秀珠，蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京：科学出版社,2001:267-295.]
DONG YH, LIAO X, XIA HJ, et al., 2018. Community structure of wild *Artemisia argyi* at Qichun in China[J]. J Jianghan Univ (Nat Sci Ed), 46(1): 58-61.
El-SAYED ASA, MOUSAFA AH, HUSSEIN HA, et al., 2020. Potential insecticidal activity of *Sarocladium strictum*, an endophyte of *Cynanchum acutum*, against *Spodoptera littoralis*, a polyphagous insect pest[J]. Biocatal Agr Biotechnol, 24: 101524.
FIGUEIRA C, FERREIRA MJ, SILVA H, et al., 2019. Improved germination efficiency of *Salicornia ramosissima* seeds inoculated with *Bacillus aryabhattai* SP1016-20[J]. Ann App Biol, 174(3) 319-328.
GIAUQUE H, CONNOR EW, HAWKES CV. 2019. Endophyte traits relevant to stress tolerance, resource use and habitat of origin predict effects on host plants[J]. New Phytol, 221(4): 2239-2249.
GONG AD, DONG FY, HU MJ, et al., 2019. Antifungal activity of volatile emitted from *Enterobacter asburiae* Vt-7 against *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage[J]. Food Control, 106: 106718.
GOUDA S, DAS G, SEN SK, et al., 2016. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance[J]. Front Microbiol, 7: 1538.
HE W, MEGHARAJ M, WU CY, et al., 2020. Endophyte-assisted phytoremediation: mechanisms and current application strategies for soil mixed pollutants[J]. Crit Rev Biotechnol, 40(1): 31-45.
HONG ZG. 2015. Study in geo-authentic of Qiai[J]. J S-Cent Univ Natl (Nat Sci Ed), 34(2): 33-37. [洪宗国. 蕲艾的道地性研究[J]. 中南民族大学学报：自然科学版, 2015, 34(2): 33-33.]
HUANG JY, ZHANG CJ, YAO YL, et al., 2017. Progress in antimicrobial substances of endophytes[J]. Chin J Biotechnol, 33(2): 178-186. [黄敬瑜，张楚军，姚瑜龙，等. 植物内生菌生物抗菌活性物质研究进展[J]. 生物工程学报, 2017, 33(2): 178-186.]
JEONG SD, Yoo SJ, KYU HJ, et al., 2019. Effect of *Bacillus aryabhattai* H26-2 and *B. siamensis* H30-3 on growth promotion and alleviation of heat and drought stresses in Chinese cabbage[J]. Plant Pathol J, 35(2): 178-187.
KANG SM, ASAF S, KHAN AL, et al., 2020. Complete genome sequence of *Pseudomonas psychrotolerans* CS51, a plant growth-promoting bacterium, under heavy metal stress

conditions[J]. Microorganisms, 8(3): 382.

KANG SM, KHAN AL, WAQAS W, et al., 2019. Integrated phytohormone production by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus tequilensis* SSB07 induced thermotolerance in soybean[J]. J Plant Interact, 14(1): 416-423.

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Mol Biol Evol, 33(7): 1870-1874.

KUMARAVEL S, SUGITHA T, SRIDAR R, et al., 2018. Draft genome sequence of plant growth-promoting and drought-tolerant *Bacillus altitudinis* FD48, isolated from rice phylloplane[J]. Genome A, 6(9): e00019-00018.

LI BY, WANG B, PAN P, et al., 2019. *Bacillus altitudinis* strain AMCC 101304: a novel potential biocontrol agent for potato common scab[J]. Biocontrol Sci Technol, 29(10): 1009-1022.

LI H, GUAN Y, DONG YL , et al., 2018. Isolation and evaluation of endophytic *Bacillus tequilensis* GYLH001 with potential application for biological control of *magnaporthe oryzae*[J]. PLOS ONE, 13(10): e0203505.

LI J, CAO JL, WANG X, et al., 2017. *Acinetobacter pittii*, an emerging new multi-drug resistant fish pathogen isolated from diseased blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in China[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 101(16): 6459-6471.

LIU RF, ZHANG Y, CHEN P, et al., 2017. Genomic and phenotypic analyses of *Pseudomonas psychrotolerans* PRS08-11306 reveal a turnerbactin biosynthesis gene cluster that contributes to nitrogen fixation[J]. J Biotechnol, 253: 10-13.

MAENG S, SATHIYARAJ S, SUBRAMANI G, et al., 2018. A report of six unrecorded radiation-resistant bacterial species isolated from soil in Korea in 2018[J]. J Spec Res, 7(3): 222-230.

MATSUMOTO A, TAKAHASHI Y. 2017. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds[J]. J Antibiot, 70(5): 514-519.

MIRA O, WOO HJ, LEE CH, et al., 2018. Nematicidal and plant growth-promoting activity of *enterobacter asburiae* HK169: genome analysis provides insight into its biological activities[J]. J Microbiol Biotechnol, 28(6): 968-975.

NONGKHLAW FMW, JOSHI SR. 2017. Microscopic study on colonization and antimicrobial property of endophytic bacteria associated with ethnomedicinal plants of Meghalaya[J]. J Microsc Ultrastruc, 5(3): 132-139

SARAH L, SHIVA PA, RENEE H, et al., 2018. Draft genome sequence of the first documented clinical *siccibacter turicensis* isolate in Austria[J]. Genome A, 6(18): e00380-18.

SHI XS, WANG DJ, LI XM, et al., Antimicrobial polyketides from *Trichoderma koningiopsis* QA-3, an endophytic fungus obtained from the medicinal plant *Artemisia argyi*[J]. Rsc Adv, 7(81): 51335-51342.

SIHEM G, HABIB C, MOHAMED N, et al., 2019. Radiation-inducible radioprotective exopolysaccharides of *Bacillus siamensis* CV5 from irradiated roots of *Cistanche violacea* to decrease free radical damage produced by ionizing radiation[J]. Int J Radiat biol, 95(11):1552-1563.

SILVA F, FERREIRA S, QUEIROZ JA, et al., 2011. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry[J]. J Med Microbiol, 60(10), 1479-1486.

SONG XW, WEN X, HE JW, et al., 2019. Phytochemical components and biological activities of

Artemisia argyi[J]. J Funct Foods, 52: 648-662.

SUHANDONO S, KUSUMAWARDHANI MK, ADITIAWATI P. 2016. Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from rambutan fruits (*Nephelium lappaceum* L.) cultivar binjai[J]. Hayati J Biosci, 23(1): 39-44.

SUTTON GG, BRINKAC LM, FOUTS DE. 2018. *Enterobacter hormaechei* subsp.*hoffmannii* subsp. nov.,*Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggenkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequenced *Enterobacter genomes*[J]. F1000Research, 7: 521.

TANG YK, KANG HY, QIN ZY, et al., 2020. Significance of manganese resistant *bacillus cereus* strain WSE01 as a bioinoculant for promotion of plant growth and manganese accumulation in *Myriophyllum verticillatum*[J]. Sci Total Environ,707: 135867.

UZMA F, MOHAN CD, HASHEM A, et al., 2018. Endophytic fungi-alternative sources of cytotoxic compounds: a review[J]. Front Pharmacol, 9(309): 1-37.

WANG J, WU L, XU L, et al., Draft genome sequence of a multidrug-resistant new delhi metallo-β-lactamase NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* sequence type 207 isolate from China[J]. J Glob Antimicrob Re, 6: 88-89.

WANG X, LI J, CAO XJ, et al., 2020. Isolation, identification and characterisation of an emerging fish pathogen, *Acinetobacter pittii*, from diseased loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in China[J]. Anton Leeuw, 113(1): 21-32.

XIANG F, BAI J, TAN X, et al., 2018. Antimicrobial activities and mechanism of the essential oil from *Artemisia argyi* Levl. et Van. var. *argyi* cv. Qiai[J]. Int Crops Products, 125: 582-587.

XIAO YS, LU JQ, MENG JM, et al., 2018. Comparative analysis of volatile oil in *Artemisiae Argyi* folium produced in qichun and some other areas by GC-MS[J]. China Pharm, **21**(3): 404-425. [肖宇硕，卢金清，孟佳敏，等. 气质联用法对蕲艾及不同产地艾叶中挥发油成分分析比较[J]. 中国药师, 2018, 21,(3): 404-410,425.]

XU BL, LUO ZY, WANG NN, et al., 2019. A method for isolation of endophytic bacteria from *Artemisia argyi*[P]. CN110317732A. [徐碧林，罗周瑜，王娜娜，等. 一种艾草内生菌的分离方法[P]. CN110317732A.]

YOO SJ, WEON HY, SONG J, et al., 2019. Induced tolerance to salinity stress by halotolerant bacteria *Bacillus aryabhattai* H19-1 and *B. mesonae* H20-5 in tomato plants[J]. J Microbiol biotechnol, 29(7):1124-1136.

YOON SH, HA SM, KWON S, et al., 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 67: 1613-1617.

YUE ZH, SHEN YH, CHEN YJ, et al., 2019. Microbiological insights into the stress-alleviating property of an endophytic *Bacillus altitudinis* WR10 in wheat under low-phosphorus and high-salinity stresses [J]. Microorganisms, 7(508): 1-12.

ZHOU C, GE NG, Guo JS, et al., 2019. Enterobacter asburiae reduces cadmium toxicity in maize plants by repressing iron uptake-associated pathways[J]. J Agric Food Chem, 67 (36):10126-10136.

ZHOU DQ, XU DQ. 2013. Tutorial for microbiology experimental[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press: 177-181. [周德庆，徐德强. 微生物学实验教程[M]. 第 3 版. 北京：高等教育出版社, 2013: 177-181.]

ZHOU X, LIU XQ, ZHAO JT, et al., 2021. The endophytic bacterium *Bacillus koreensis* 181-22 promotes rice growth and alleviates cadmium stress under cadmium exposure[J]. Appl Microbiol Biot, 105:8517-8529.